

**UNIVERSIDADE DE LISBOA**  
**FACULDADE DE FARMÁCIA**



**Células endoteliais progenitoras.**  
**Interesse do seu estudo na hemato-oncologia**

**Ana Rita Vidal da Silva Gomes**

**MESTRADO INTEGRADO EM CIÊNCIAS**  
**FARMACÊUTICAS**

**2016/2017**

**UNIVERSIDADE DE LISBOA**  
**FACULDADE DE FARMÁCIA**



**Células endoteliais progenitoras.**  
**Interesse do seu estudo na hemato-oncologia**

**Ana Rita Vidal da Silva Gomes**

**Monografia de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas apresentada  
à Universidade de Lisboa através da Faculdade de Farmácia**

**Orientador: Professora Doutora Maria Leonor Correia**

**2016/2017**

## Índice

1. Agradecimentos	pág. 6
2. Resumo/Abstract	pág. 7
3. Lista de abreviaturas	pág.9
4. Materiais e métodos	pág. 11
5. Introdução	pág. 11
5.1 Células endoteliais progenitoras	pág. 11
5.1.2 Isolamento	pág. 14
5.1.2.1 Método da cultura celular	pág. 14
5.1.2.2 Citometria de fluxo	pág. 15
5.1.2.3 Controvérsia	pág. 17
6. A intervenção da medula óssea nas doenças hemato-oncológicas: Interações entre células da matriz extracelular	pág. 19
7. A participação das células endoteliais progenitoras na angiogénese	pág. 20
8. Função das citocinas e fatores de crescimento na angiogénese	pág. 22
9. Patologia hemato-oncológica	pág. 25
9.1 Classificação da Organização Mundial de Saúde dos tumores do tecido hematopoiético e linfático (2016)	pág. 25
9.2. Mieloma Múltiplo	pág. 27
9.2.1 Células endoteliais progenitoras: um novo potencial biomarcador	pág. 28
9.2.2 A utilidade das células endoteliais progenitoras no mieloma múltiplo	pág.29
9.3 Síndrome mielodisplásica	pág. 29
9.3.1 A angiogénese na síndrome mielodisplásica	pág. 30

9.3.2 Influência das células endoteliais progenitoras na caracterização da Síndrome mielodisplásica	pág. 31
9.4 Síndromes mieloproliferativas	pág. 32
9.4.1 Leucemia mielóide aguda	pág. 32
9.4.1.1 Estudo das células endoteliais progenitoras como biomarcador na leucemia mieloide aguda	pág. 33
9.4.2 Leucemia mielóide crónica	pág. 34
9.4.2.1 Descoberta do gene de fusão BCR-ABL nas células endoteliais	pág. 34
9.5 Leucemia linfocítica aguda na criança	pág. 35
9.6 Leucemia linfocítica crónica B	pág. 36
9.7. Linfoma não- Hodgkin	pág. 37
9.7.1 O perfil da expressão genética das células endoteliais progenitoras do nódulo linfático sugere diferentes papéis no crescimento do linfoma	pág. 38
9.8 Leucemia de células T do adulto	pág. 39
9.8.1 O papel do sistema vascular no seu desenvolvimento	pág. 39
9.8.2 Quantificação de células endoteliais progenitoras em portadores assintomáticos	pág. 40
10. Resultados e discussão	pág. 40
11. Conclusão e perspectivas futuras	pág. 41
12. Referências bibliográficas	pág. 43

## **Índice de Figuras**

Figura 1 - Origem e diferenciação das células endoteliais progenitoras	pág.14
Figura 2 - Esquema da identificação fenotípica celular pelo uso de anticorpos monoclonais diretamente conjugados a fluorocromos, por citometria de fluxo	pág.17
Figura 3- Representação esquemática do microambiente da medula óssea e respectivos nichos	pág.20
Figura 4 - Angiogénese	pág. 22
Figura 5 - Ação do fator de crescimento endotelial vascular na neoformação vascular tumoral	pág. 25

## **Índice de Tabelas**

Tabela 1 - Classificação dos tumores dos tecidos hematopoiéticos e linfáticos. (OMS-2016)	pág. 26
Tabela 2 - Classificação da OMS de neoplasias mielóides e leucemias agudas	pág. 27

## **1. Agradecimentos**

Em primeiro lugar, quero agradecer à Professora Doutora Leonor Correia pela disponibilidade e apoio prestado sempre que solicitei.

Quero também agradecer às minhas duas grandes amigas de faculdade, Cláudia Costa e Mariana Caires Pereira, que ao longo destes anos, sempre me deram a sua amizade pura e me incluíram nas suas vidas como se de uma irmã se tratasse. Sem vocês este percurso, já por si desafiante, teria sido muito mais atribulado e menos prazeroso.

Não posso deixar de agradecer ao meu namorado, Pedro Monteiro, por ser compreensivo com a minha má disposição e tentar levá-la com “ânimo leve”, nomeadamente na “reta final” da escrita desta monografia. Agradeço-lhe, principalmente, por ter sempre acreditado em mim e motivar-me nos momentos em que eu própria duvidava.

Outro agradecimento vai para as pessoas, da minha entidade patronal, que sempre me deram a mão nos momentos em que eu mais precisei, sendo compreensivas e dando soluções viáveis para que não fosse prejudicada no meu percurso académico, acabando, por vezes, por ficar os meus deveres laborais para segundo plano. Neste campo, também tenho que agradecer à maravilhosa família da Farmácia do Bairro, onde estagiei, por sempre terem sido compreensivos e flexíveis em relação ao meu horário laboral tendo em conta as minhas obrigações.

Por fim, o meu maior agradecimento vai para a pessoa mais importante de todas, aquela que sempre me deu o apoio que precisava nos momentos mais difíceis da minha vida a todos os níveis – o meu querido PAI. Findos todos estes anos e graças a ele, cheguei ao fim do meu curso, com todos os “degraus” percorridos. E com a certeza, de que era este o meu “caminho”.

## 2. Resumo

A neovascularização, na forma de vasculogénese ou angiogénese, constitui um evento essencial para que ocorra o desenvolvimento humano, tendo em conta que é nesta fase que o sistema vascular sofre expansão. Embora seja a vasculogénese o processo característico do desenvolvimento embrionário, a vasculogénese pós-natal também demonstrou estar presente em condições fisiológicas e patológicas. Processos fisiológicos e patológicos, como o cancro, têm a angiogénese como importante elemento sendo frequentemente associada ao nível de agressividade tumoral, em alguns tipos de tumores, incluindo os hematológicos. A vasculogénese pós-natal é caracterizada pelo recrutamento de células progenitoras derivadas da medula óssea, designadas por células endoteliais progenitoras, que migram para os locais de neovascularização, incorporaram os vasos recém-formados e se diferenciam em células endoteliais maduras. Somente tumores avançados com alta heterogeneidade e capacidade proliferativa recrutam estas células para a neovascularização, sendo que a transformação maligna requer a presença de um microambiente fértil onde as células tumorais proliferam, que é constituído por um sistema complexo de células do estroma medular e novos vasos sanguíneos. Também os fatores de crescimento têm, aqui, um papel importante ao fazerem com que ocorra a mobilização das células endoteliais progenitoras para o local da neovascularização.

Nesta monografia, que se baseou numa revisão da literatura, destaca-se o papel das células endoteliais progenitoras na patogénese de diversas doenças hemato-oncológicas, nomeadamente no mieloma múltiplo, na leucemia mielóide crónica, na leucemia mielóide aguda, na leucemia linfocítica e nas síndromes mielodisplásicas, avaliando a sua contribuição como possível alvo terapêutico e potencial biomarcador da progressão da doença.

A sua implicação, no desenvolvimento dos vasos sanguíneos, atrai diversos pesquisadores e apesar do avanço na identificação e na caracterização das propriedades funcionais das células endoteliais progenitoras, a sua biologia celular básica não está ainda definida e o seu papel fisiológico ainda continua a ser objeto de debate.

**Palavras-chave:** Angiogénese; célula endotelial progenitora; biomarcador; alvo terapêutico; hemato-oncologia

## **Abstract**

Neovascularization, as vasculogenesis or angiogenesis, is an essential event for human development to occur, taking into account that it is at this stage that the vascular system undergoes expansion. Although vasculogenesis is the usual process in embryonic development, postnatal vasculogenesis has also been shown to be present in physiological and pathological conditions. Physiological and pathological processes such as cancer have angiogenesis as an important element and are often associated with the level of tumor aggressiveness in some types of tumors including hematological tumors. Postnatal vasculogenesis is characterized by the recruitment of bone marrow derived progenitor cells, referred to as progenitor endothelial cells, which migrate to neovascularization sites, incorporate newly formed vessels and differentiate into mature endothelial cells.

Only advanced tumors with high heterogeneity and proliferative capacity recruit these cells for neovascularization, and malignant transformation requires the presence of a fertile microenvironment where tumor cells proliferate, which consists of a complex system of medullar stromal cells and new blood vessels.

Also, growth factors have an important role in mobilizing progenitor endothelial cells to the site of neovascularization.

In this monograph, which was based on a review of the literature, the role of progenitor endothelial cells in the pathogenesis of various hemato-oncological diseases, like multiple myeloma, chronic myeloid leukemia, acute myeloid leukemia, lymphocytic leukemias and myelodysplastic syndromes, is highlighted for its contribution as a possible therapeutic target and potential biomarker of disease progression.

Its implication in the development of blood vessels has attracted several researchers and despite the advances in the identification and characterization of functional properties of progenitor endothelial cells, its basic cellular biology is not yet defined and its physiological role still remains the object of debate.

**Keywords:** Angiogenesis; progenitor endothelial cell; biomarker; therapeutic target; hemato-oncology



### 3. Lista de Abreviaturas

**AcMo-** Anticorpo Monoclonal

**$\beta_2$ M-** beta-2microglobulina

**CE-** célula endotelial

**CEM-** células estaminais mesenquimais

**CEMO-** células do estroma da medula óssea

**CEH-** Células estaminais hematopoiéticas

**CEPs-** células endoteliais progenitoras

**CEPC-** Células endoteliais progenitoras circulantes

**CEP-NL-** Células endoteliais progenitoras no nódulo linfático

**CFCE/s-** colônia/s formadora/s de células endoteliais

**CLT-** contagem leucocitária total

**CMN-** Células mononucleadas

**DMV-** Densidade microvascular

**IL-** Interleucina

**FCEV-** Fator de crescimento endotelial vascular

**FCFb-** Fator de crescimento do fibroblasto básico

**FCH-** Fator de crescimento de hepatócitos

**FNT- $\alpha$ -** Fator de necrose tumoral alfa

**FEC-GM-** Fator estimulante de colônia grânulo-monocítica

**FEC-G-** Fator estimulante da colônia dos granulócitos

**FNT-  $\beta$  –** Fator de necrose tumoral beta

**FN- $\kappa\beta$ -** Fator nuclear kappa beta

**FTC-  $\beta$** - Fator de transformação do crescimento beta

**FvW**- Fator de vonWillebrand

**GMSI**- Gamopatia Monoclonal de Significado Indeterminado

**Ig/s**- Imunoglobulina/s

**IGH**- Imunoglobulina de cadeia pesada

**IFN- $\alpha$** - Interferão  $\alpha$

**KDR**- *Kinase-insert Domain Receptor in Humans*

**LLC-B**- Leucemia linfocítica crónica B

**LBD**- Lipoproteína de baixa densidade

**LMA**- Leucemia mielóide aguda

**LMC**- Leucemia mielóide crónica

**LTA**- Leucemia de Células T do Adulto

**MACV**- Molécula de adesão celular vascular

**MAI**- Molécula de adesão intercelular

**MEC**- Matriz extracelular

**MM**- Mieloma Múltiplo

**MO**- Medula óssea

**MPM-9**- Metaloproteinase da matriz 9

**OB**- Osteoblastos

**RC**- Resposta completa

**RFCEV**- Recetor do fator de crescimento endotelial vascular

**sKIT**- Solúvel KIT

**SP**- Sangue periférico

**VLHT1**- Vírus Linfotrópico Humano de Células T do tipo 1

## **4. Materiais e Métodos**

Este trabalho é um estudo descritivo, que utiliza a revisão da literatura, efetuada entre Julho e Novembro de 2017. As principais palavras-chave pesquisadas tanto na língua portuguesa quanto inglesa, foram: angiogénese, leucemia, linfóide, aguda, crónica, mieloide, fatores angiogénicos, células endoteliais progenitoras, mieloma múltiplo, tumores hematopoiéticos, neoplasia.

Foram pesquisadas artigos, nacionais e internacionais, entre o período de 1960 até 2017, relativas a estudos de ensaio clínico envolvendo estudos *in vitro* e *in vivo* (caso-controlo, *coorte*) e revisões sobre o processo da angiogénese, tipos de leucemias e outras neoplasias e fatores angiogénicos envolvidos na origem de tumores. A pesquisa baseou-se em várias bases de dados tais como, Literatura Latino-Americana e do Caribe em Ciências da Saúde (LILACS), Scientific Electronic Library Online (SciELO), Pubmed e Google Scholar.

## **5. Introdução**

### **5.1.1 Células Endoteliais Progenitoras**

A primeira evidência da existência de células circulantes, originadas na medula óssea, com capacidade de se diferenciar em células da linhagem endotelial data o ano de 1997 [1]. Estas células, designadas por células endoteliais progenitoras (CEPs), iniciaram uma robusta investigação experimental em animais e humanos sendo que a 1 de Janeiro de 2011 a base de dados do PubMed já contava com perto de 9500 artigos publicados, quando pesquisado o termo “endothelial progenitor cell”. As CEPs, têm sido definidas como células precursoras endoteliais que possuem propriedades semelhantes às dos angioblastos embrionários e que têm capacidade para circular, proliferar e diferenciar-se em células endoteliais (CEs) maduras, com a diferença de que ainda não adquiriram marcadores caraterísticos endoteliais maduros e ainda não formaram um lúmen. Sabe-se também que aderem ao endotélio nos locais de hipóxia/isquémia e participam na formação de novos vasos pela indução e modulação da vasculogénese e da angiogénese [2,3].

Previamente, pensou-se que as CEPs estavam presentes apenas durante o desenvolvimento embrionário. No entanto atualmente, existem provas suficientes que mostram a sua persistência na vida adulta, o que gerou interesse no seu uso para a neovascularização de tecidos isquêmicos ou lesados e em indivíduos com fatores de risco para doenças que têm avascularização comprometida [4].

Os estudos que têm sido desenvolvidos, até à data, levaram à identificação de dois tipos de CEPs: as células hematopoiéticas proangiogénicas, correspondentes a células de origem hematopoiética que promovem angiogénese através de efeitos parácrinos; e colónias formadoras de células endoteliais (CFCEs), que são capazes de gerar uma descendência de células endoteliais fenotípicas e funcionalmente competentes capazes de formar vasos *in vivo*. Basicamente, dois tipos de células hematopoiéticas proangiogénicas foram identificados, um com um fenótipo mais maduro e correspondente a células monocíticas, Tie2<sup>+</sup> e uma população imatura de células progenitoras correspondente a células progenitoras hematopoiéticas proangiogénicas. Os estudos realizados nestes últimos anos, em células hematopoiéticas proangiogénicas, levaram à conclusão de que essas células derivam da diferenciação de um subconjunto de células progenitoras hematopoiéticas, caracterizadas pela positividade para CD34, CD133 e recetor do fator de crescimento endotelial vascular 2 (RFCEV-2), mobilizado a partir da MO por fatores de crescimento angiogénicos e contribuindo *in vivo* para uma resposta angiogénica apenas através de um efeito indireto baseado em mecanismos parácrinos. Estudos subsequentes forneceram evidência de que existem diferentes tipos de células endoteliais derivadas de CEPs que podem ser discriminadas de acordo com o potencial autónomo proliferativo das células e que as células endoteliais derivadas das CEPs exibem uma hierarquia de capacidade proliferativa, remanescente da hematopoiética hierarquia das células progenitoras. Como já era esperado, as células endoteliais derivadas de CEP do sangue do cordão umbilical apresentam um maior potencial de proliferação do que aqueles derivados do sangue periférico (SP) [5].

Para além da presença na medula óssea, estudos recentes, têm indicado fontes alternativas de CEPs incluindo sangue do cordão umbilical e tecido embrionário, mas também a presença de um número mínimo de CEPs no coração, grandes vasos sanguíneos, tecido músculo-esquelético e tecido adiposo [6].

Atualmente, considera-se que as CEPs são preservadas num nicho quiescente da MO cujo ambiente é de baixa tensão de oxigénio e alto conteúdo em fator derivado da célula estromal 1

(FCE-1), uma quimiocina responsável por mantê-las no local. Nos casos de trauma ou cicatrização de feridas associadas a hipoxia, as CEPs são estimuladas a deixar este nicho, alcançar o nicho proliferativo e entrar na circulação. Deste modo, as CEPs migram em direção ao seu tecido alvo, são ativadas e, posteriormente, aderem às CEs do vaso e começam a migração transendotelial para futura remodelação vascular atingindo o local de remodelação do vaso. Por fim, diferenciam-se em CEs e/ou interagem com as CEs presentes [6].

Dados experimentais, mostraram que as CEPs podem ser isoladas de células mononucleadas do SP e podem ser quantificadas. Tanto as CEs quanto as CEPs são raras na circulação sanguínea e perfazem entre 0,01% e 0,0001% das células mononucleadas periféricas [7].

Embora as características que definem a diferenciação destas células ainda não tenham sido completamente definidas, considera-se que a perda do marcador de membrana CD133 distingue as CEPs de CEs maduras. A falta de uma definição universal, uma caracterização fenotípica unificada e métodos padronizados de detecção tornam as comparações muito difíceis, e as interpretações dos estudos com CEPs devem ser analisadas com cautela. As CEPs de doentes com diabetes mellitus tipo 2 são caracterizadas por diminuída capacidade proliferativa, diminuída adesão e menor capacidade de formar vasos capilares *in vitro*. Os mecanismos responsáveis por estas limitações não são conhecidos, mas pensa-se que seja devido à diminuída mobilização de CEPs da MO, ao aumento do seu consumo, à sua orientação para locais danificados e, por fim, à sua vida média reduzida [4].

Para além da diabetes, fatores de risco para doenças cardiovasculares como hipertensão arterial, hiperlipidémia e tabagismo contribuem para a redução do número e funcionalidade das CEPs, tanto em indivíduos com doença coronária como em indivíduos saudáveis. Em contrapartida, a prática de atividade física atua de forma positiva sobre as CEPs, aumentando o número de células circulantes. Também as terapias com inibidores do sistema renina-angiotensina, estatinas ou eritropoietina promovem o aumento das mesmas. Deste modo, pode-se considerar que as CEPs são o espelho da saúde vascular [8].

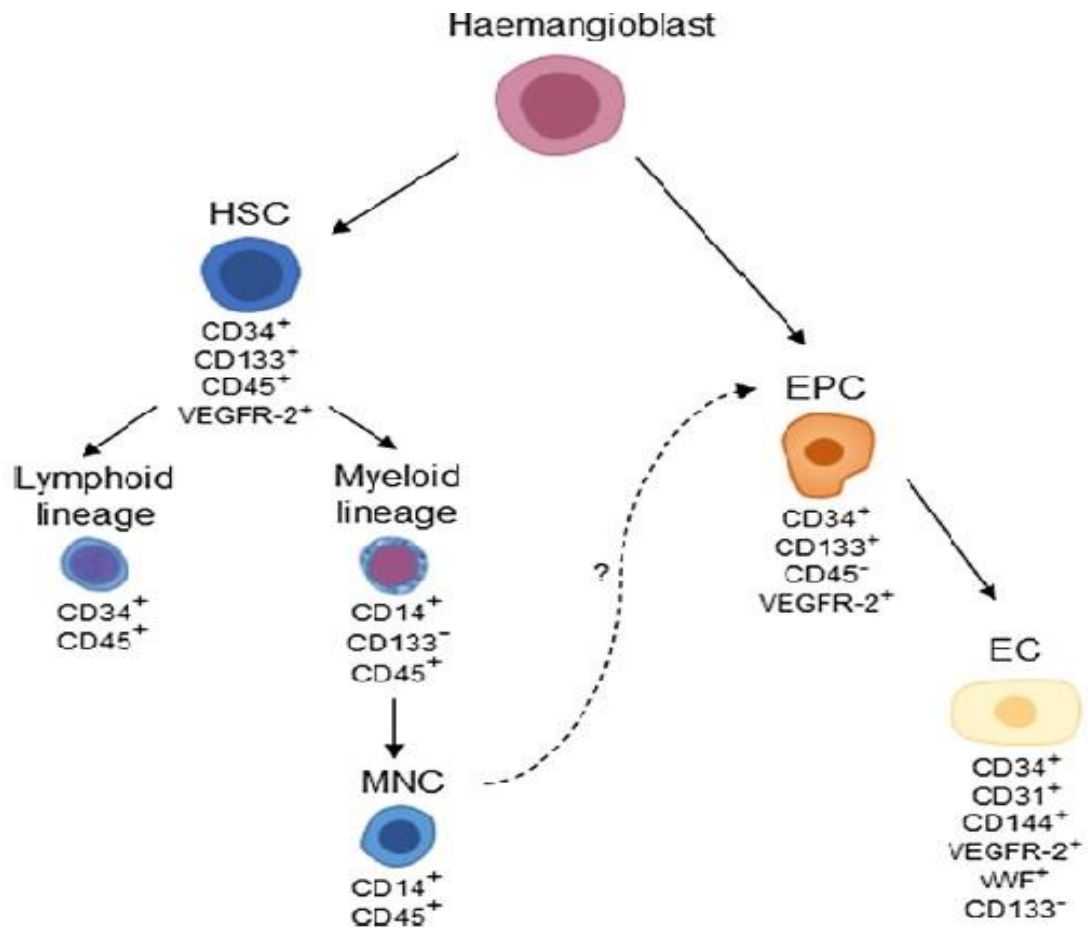


Figura 1- Origem e diferenciação das células endoteliais progenitoras. Retirado de [6]. *HSC*: Hematopoietic stem cell; *EPC*: Endothelial progenitor cell; *EC*: Endothelial cell; *VEGFR-2*: Vascular endothelial grow factor receptor 2; *wf*: von Willebrand factor; *MNC*: Mononuclear cells; *CD*: Cluster of differentiation

## 5.1.2 Isolamento

### 5.1.2.1 Método da Cultura Celular

Atualmente, supostas CEPs têm sido identificadas usando dois tipos de abordagens: a cultura celular e a citometria de fluxo de amostras de SP. A primeira, e talvez a mais simples de todas, envolve a recolha de células mononucleadas (CMN) de baixa densidade do SP ou

sangue do cordão umbilical e, de seguida, a incubação em placas revestidas com fibronectina num meio contendo o fator de crescimento endotelial vascular (FCEV) e soro bovino fetal [3]. Uma característica distintiva das CEPs é a formação tardia de colónias (após 14 dias em cultura) em comparação com CEs mais diferenciadas, que formam colónias após apenas 7 a 10 dias em cultura. Após 4-5 dias em cultura, as células não aderentes são removidas e as aderentes são examinadas para avaliar a sua capacidade de ligação à lipoproteína de baixa densidade (LBD) e à *Ulexeuropaeus* aglutinina 1, uma lectina. Esta cultura recém-formada apresenta *clusters* típicos compostos por células centralmente redondas e por células em forma de fuso na periferia. Estes *clusters* foram chamados de CFCEs, e o ensaio foi denominado de "ensaio UFC". Segundo este ensaio, podemos caraterizar as CEPs com base na sua morfologia, adesão à fibronectina, captação da LBD e ligação à lectina. Ao conjunto destas caraterísticas dá-se o nome de fenótipo da célula [3].

#### 5.1.2.2 Citometria de Fluxo

A identificação de CEPs por citometria de fluxo e baseia-se na imunomarcação com anticorpos direcionados aos antígenos de superfície ou intracelulares das células [9].

Este método tem duas limitações importantes: primeiro, não conhecemos o fenótipo antigénico preciso das CEPs, principalmente porque ele se sobrepõe com o de outras linhagens celulares (é por isso que sempre nos devemos referir como "supostas CEPs") e segundo, a raridade da circulação de CEPs impõe o uso de um número muito limitado de antígenos de superfície [9].

Apesar das limitações, a citometria de fluxo é, atualmente, o melhor método para obter dados quantitativos puros sobre as supostas CEPs. A sensibilidade, especificidade e reprodutibilidade fazem da citometria de fluxo o "golden standard" quando a quantificação de CEPs do SP é idealizado como biomarcador de doenças. Para definir o fenótipo antigénico de CEPs de acordo com o termo "progenitores endoteliais", devemos usar pelo menos um marcador de imaturidade/estaminal e pelo menos um marcador da linhagem endotelial. Os marcadores estaminais mais usados em seres humanos são o CD34 e CD133 sendo que os da linhagem endotelial são os KDR, CD31 e fator de von Willebrand (FvW). O KDR também é expresso noutro tipo de células, para além das células endoteliais e estaminais. Deste modo,

evidencia-se que o CD34 e KDR exibem uma expressão similar em células estaminais e endoteliais, uma vez que são expressos em hemangioblastos primários do saco vitelino mesodérmico durante a vasculogénese embrionária precoce [9].

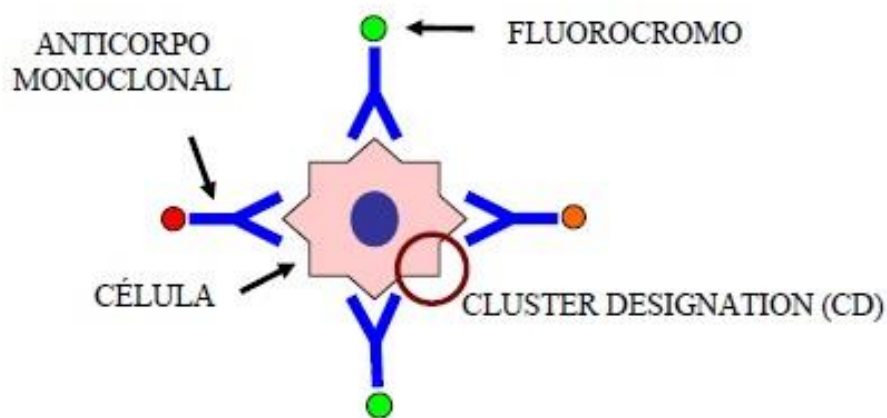
As células CD34<sup>+</sup> KDR<sup>+</sup> podem ser células imaturas com iniciação endotelial e, portanto, podem representar supostas CEPs. Esta definição antigénica é o mais consistente com a descrição original por Asahara e col. [10], que mostrou que as células do sangue periférico humano organizadas de acordo com a expressão de CD34 ou KDR, diferenciam-se em células endoteliais maduras e formam novos vasos *in vivo*.

Asahara e col. (1997) [10], isolaram células que expressavam CD34<sup>+</sup> do SP, relataram que a adesão às placas cobertas com fibronectina era significativamente maior do que em placas cobertas com colagénio tipo 1 e também afirmaram que a morfologia apresentada era em forma de fuso [3]. A escolha do marcador CD34 como potencial marcador do angioblasto circulante, deve-se ao conhecimento da sua expressão pelas células endoteliais e também pelo facto de este já ser utilizado como marcador para células hematopoiéticas estaminais e progenitoras no isolamento de células para transplante estaminal. Contudo, as células estaminais hematopoiéticas (CEHs) à medida que se diferenciam vão perdendo este marcador. O CD34 é largamente expresso em algumas células da linhagem mesenquimal, epitelial e na população de células cancerígenas, sendo apenas uma pequena minoria a quantidade de células endoteliais circulantes que expressam este marcador. Deste modo, o uso deste marcador como marcador individual de CEPs é inviabilizado e sugere a pesquisa de outra opção [3].

Peichev e col. (2000) [2], percebendo que as CEPs partilham alguns padrões de expressão de antígenos de superfície com células estaminais hematopoiéticas e células progenitoras, escolheu separar células do SP pela expressão de CD34, KDR e CD133 [3].

Ao contrário do CD34, o CD133 nunca é expresso em células endoteliais maduras e, portanto, células CD133<sup>+</sup> KDR<sup>+</sup> correspondem melhor às supostas CEPs. Infelizmente, o CD133 é expresso em células mais imaturas do que CD34 e, por esse motivo, as células CD133<sup>+</sup> KDR<sup>+</sup> são mais raras do que células CD34<sup>+</sup> KDR<sup>+</sup> na circulação, em condições de repouso. Apesar destas limitações, ambos CD34<sup>+</sup> KDR<sup>+</sup> e CD133<sup>+</sup> KDR<sup>+</sup> podem ser incluídos nos fenótipos antigénicos das supostas CEPs. A intersecção entre estes dois (isto é, CD34<sup>+</sup> CD133<sup>+</sup> KDR<sup>+</sup>) facilmente poderia ser usada como um fenótipo exclusivo das CEPs, contudo, estas células são tão raras na circulação que se torna difícil a sua identificação [9].





**Figura 2**-Esquema da identificação fenotípica celular pelo uso de anticorpos monoclonais diretamente conjugados a fluorocromos, por citometria de fluxo. Retirado de [28].

### 5.1.2.3 Controvérsia

O método da cultura celular ficou simplificado através da empresa “Stem Cells Technologies Inc” que detém a patente para o ensaio Endo Cult Liquid Medium Kit TM, cujo objetivo é o isolamento de uma CFCE através de um método fácil de utilizar e de obtenção de resultados em apenas 5 dias, em vez de culturas de 2 semanas como era habitual. Apesar da adesão generalizada a este kit, alguns grupos de pesquisas continuaram a preferir os antigos protocolos e com estes dois ensaios a serem colocados em prática, rapidamente, tornou-se claro que dois grandes tipos de CEPs podem ser distinguidos fenotipicamente numa cultura de células mononucleadas cultivadas em meio endotelial. As células que são formadas em três dias após a incubação e se organizam em aglomerados foram designadas de “CEPs precoces”, exibem limitada capacidade de proliferação e desaparecem após duas semanas de cultura. As células que sobrevivem a mais de 2-3 semanas de cultivo foram designadas de “CEPs verdadeiras”, são as que mostram uma morfologia mais típica das células endoteliais e têm

um maior potencial de proliferação. Tanto as “CEPs precoces” como as “CEPs verdadeiras” são ac LBD<sup>+</sup> Lectina<sup>+</sup>, mas as “CEPs verdadeiras” expressam maior densidade de marcadores de linhagem endotelial e têm maior potencial vasculogénico do que as “CEPs precoces” [9].

Deste modo, foi sugerido que as “CEPs precoces” exibem características de células mielóides e que a sua moderada capacidade de estimular a regeneração vascular ocorre principalmente através da secreção de fatores de crescimento, ao invés de integrar fisicamente a vasculatura. As “CEPs precoces” começaram, assim, a ser consideradas como uma manifestação da extrema plasticidade da linhagem dos monócitos/macrófagos que, em certas condições, pode assumir um fenótipo típico endotelial. Atualmente, é amplamente aceite que, “CEPs precoces” podem ser definidas como células CD133<sup>+</sup> / CD34<sup>+</sup> / KDR<sup>+</sup> / CD45<sup>+</sup>, enquanto as “CEPs verdadeiras” são positivas para CD34 e VEGFR2, negativas para CD133 e CD45 e expressam nas suas membranas moléculas típicas das CEs maduras, tais como VE-caderina e VCAM-1 [6].

Quirici e col. [11] conseguiram demonstrar que as “CEPs verdadeiras” e as CEPs monocíticas não estão relacionados clonalmente, pois as CEPs monocíticas são derivadas de HSCs, enquanto as CFCE são derivadas diretamente de hemangioblastos, representando assim as CEPs reais.

Juntando todas as evidências, acaba-se por se questionar se as células que foram previamente identificadas como CEPs circulantes realmente representam CEPs ou se são, mais precisamente, monócitos angiogénicos ou vasculogénicos [6].

Assim, a aceitação de acLBD e a ligação de lectina deixaram de ser os critérios indicados para definir CEPs, e a expressão de marcadores endoteliais (incluindo CD31, KDR e FvW), juntamente com evidências de morfologia endotelial são, atualmente, os critérios mínimos para a sua validação. A caracterização adicional deve incluir um estudo de expressão de outros marcadores (como CD45, CD34, CD133, CD117) e, o mais importante, a produção de ensaios *in vivo* para demonstrar que as células isoladas são incorporadas biologicamente no endotélio [9].

## **6. A intervenção da medula óssea nas doenças hemato-oncológicas: Interações entre células da matriz extracelular**

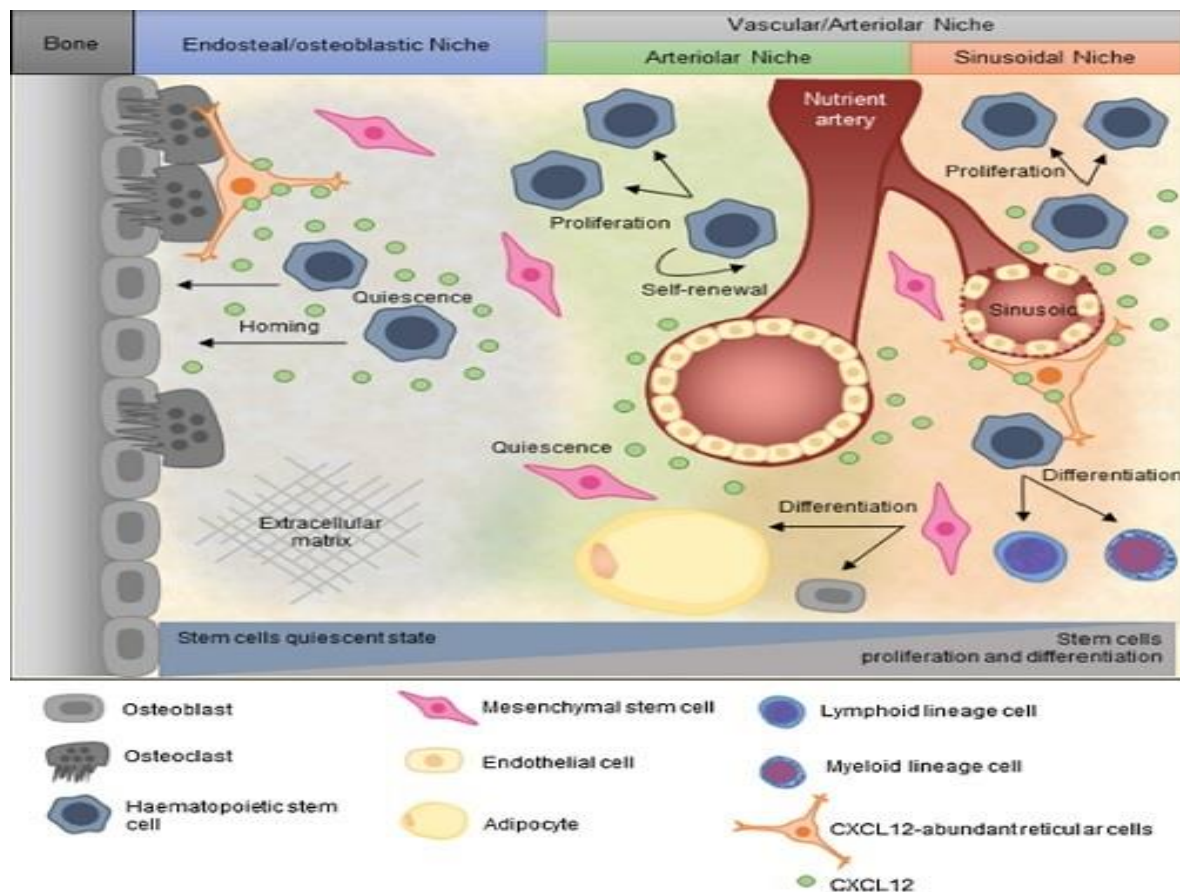
A MO é constituída por dois tipos de compartimentos: o celular e o não celular. O compartimento celular é composto por CEH e células não hematopoiéticas, as células do estroma da medula óssea (CEMO). A população de CEMO é formada por osteoblastos (OBs), CEs e células estaminais mesenquimais (CEM), entre outras [12].

As células estromais podem se diferenciar em várias linhagens, podendo originar OBs, condrócitos e adipócitos. Enquanto a população de CEH origina todos os tipos de células sanguíneas, as células não hematopoiéticas dão origem a uma variedade de células importantes para a manutenção da MO [6].

O rico microambiente da MO é composto por várias populações de células e microambientes distintos, designados de nichos tais como o nicho endosteal/osteoblástico e o nicho vascular/arteriolar. Estes, têm como função regular as células que abrigam. O nicho vascular/arteriolar, no qual as CEs são um componente forte, é dividido em nicho arteriolar quiescente e nicho sinusoidal. A MO possui uma única via de irrigação de sangue, o que a distingue do sistema circulatório restante. A fonte de sangue principal constitui a artéria nutritiva, que entra através do córtex (periferia óssea) e que leva o fluxo sanguíneo aos sinusoides. Estes, são capilares altamente permeáveis formados por CEs fenestradas intercaladas por camadas de membrana basal descontínua [6].

O compartimento não celular é composto pela matriz extracelular (MEC) e o meio líquido adjacente que inclui citocinas, fatores de crescimento e quimiocinas [12]. A MEC é uma rede complexa composta por quatro grandes classes de macromoléculas: colagénios, proteoglicanos (PGs), glicosaminoglicanos (GAGs) e glicoproteínas adesivas, que proporcionam um suporte físico para a sustentação da estrutura tecidular, determinando a hidratação e consequentemente o volume do tecido, criando espaços para o transporte de moléculas, organização dinâmica e resistência às forças de compressão. As interações entre as células e a MEC são cruciais para determinar os padrões de comportamento celular, tais como crescimento, morte, diferenciação e mobilidade que, por sua vez, apresentam importância em diversos mecanismos, como a morfogénese, inflamação, resposta imune, invasão parasitária, transformação celular e metástase. A interação de células tumorais com a membrana basal e a MEC no processo de invasão tumoral pode ser dividida em três etapas: 1 – Degradação da

MEC por enzimas segregadas pelas células tumorais: metaloproteinases, collagenases, plasmina, catepsinas, glicosidasas e heparanases. Estas enzimas estão associadas com a invasão, pois levam à desorganização e à fragmentação dos componentes do estroma e da membrana basal; 2 – Adesão da célula tumoral via receptores específicos da superfície celular, que geralmente interagem com componentes da MEC; 3 – Locomoção da célula tumoral na região da MEC previamente degradada pelas enzimas [13].



**Figura 3-** Representação esquemática do microambiente da medula óssea e respectivos nichos. Retirado de [6].

## 7. A participação das células endoteliais progenitoras na angiogénese

O crescimento neoplásico é dependente da angiogénese. O aumento da massa tumoral durante os estadios iniciais do crescimento tumoral resulta da criação de um ambiente de hipóxia que

leva à produção de fatores de crescimento pró-angiogénicos e marca o início da angiogénese [14].

A angiogénese é importante para a proliferação e metastização das neoplasias malignas. As células intermediárias na angiogénese são as CEPs ou, os também designados, angioblastos. Os potenciais mecanismos para a ocorrência de angiogénese induzida por CEPs, incluem o aumento do suprimento de células endoteliais pela proliferação e diferenciação endotelial de CEPs e/ou o aumento da secreção de fatores de crescimento que ativam as células endoteliais maduras residentes [15].

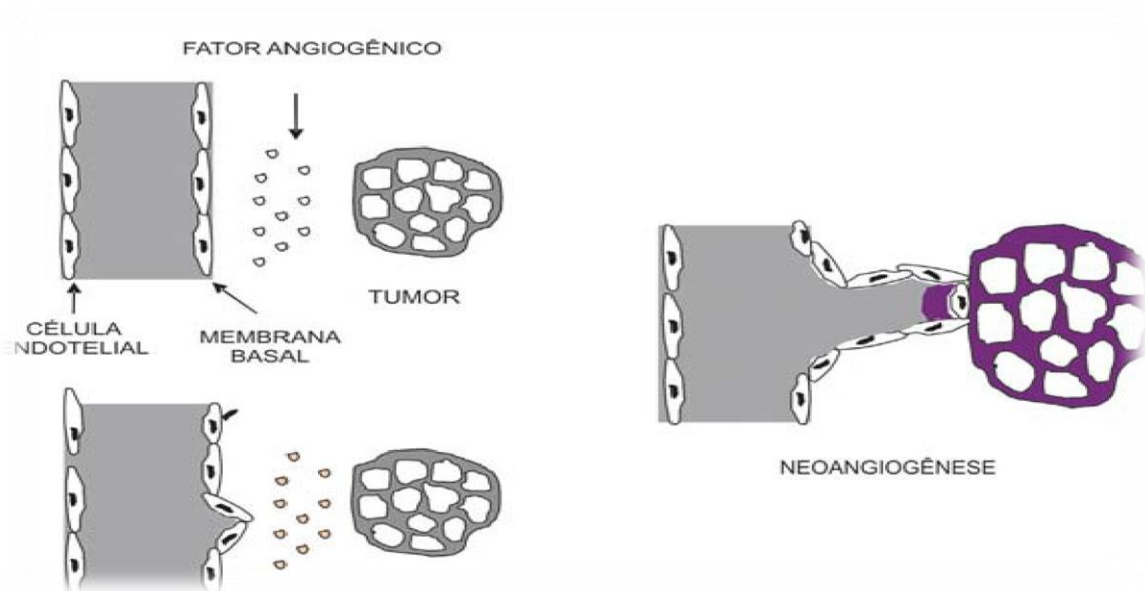
As CEPs proliferam e integram o plexo capilar primário que forma a rede vascular primitiva. Esta rede inicial é então completada através da angiogénese, que representa o processo mais comum de desenvolvimento vascular. Alguns ensaios definiram a vasculogénese pós-natal, como o recrutamento de células progenitoras endoteliais oriundas da MO para locais de neoformação vascular com subsequente diferenciação em células endoteliais maduras com intensa capacidade de proliferação local [7].

O crescimento de tumores depende da sua capacidade de adquirir, dentre outras coisas, suprimento sanguíneo adequado. As células não sobrevivem se perderem a capacidade de receber oxigénio e nutrientes ou se estão incapacitadas de libertar moléculas tóxicas. A transformação maligna requer a presença de um microambiente fértil onde as células tumorais proliferem, que é constituído por um sistema complexo de células do estroma medular e novos vasos sanguíneos [7].

Está comprovado que as células endoteliais contribuem para esta angiogénese tumoral, que surge da ramificação de vasos vizinhos ao tecido neoplásico em formação.

Pesquisadores investigaram o mecanismo de tropismo e incorporação das CEPs durante a neovascularização num modelo tumoral usando CEPs de embriões de ratos como modelo experimental. Neste estudo, observou-se que as CEPs mantêm a sua capacidade de contribuir para a angiogénese tumoral na vida adulta e não só na fase embrionária como era expectável. Dados recentes obtidos em modelos experimentais mostraram ainda que somente tumores avançados com alta heterogeneidade e capacidade proliferativa recrutam CEPs para a neovascularização. O aumento da angiogénese demonstrou ser um fator de prognóstico importante em tumores sólidos e várias patologias hematológicas. Em hemato-oncologia, foi associado à síndrome mielodisplásica (SMD), à leucemia mielóide crónica (LMC), à leucemia mielóide aguda (LMA) e ao mieloma múltiplo (MM) [7].

Atualmente, pensa-se que o verdadeiro motivo que leva ao desencadeamento da angiogênese, se deve à alteração do equilíbrio entre os estímulos proangiogênicos e antiangiogênicos num determinado tumor [16].



**Figura 4-Angiogênese.** Retirado de [7].

## 8. Função das citocinas e dos fatores de crescimento na angiogênese

Várias citocinas foram indicadas como responsáveis pela condução do processo de neovascularização em tumores sólidos e patologias hematológicas. As células neoplásicas plasmáticas podem secretar várias citocinas, incluindo o FCEV, FCFb e fator de crescimento de hepatócitos (FCH), isto é, todos os fatores proangiogênicos conhecidos [16]. Estes fatores angiogênicos associados às proteínas da matriz extracelular, fibronectina e colagénio promovem a diferenciação das CEPs circulantes. A mobilização das células hematopoéticas pró-angiogênicas originárias da MO é um processo dinâmico que requer a ativação de metaloproteinases mediadas por fatores angiogênicos, especialmente a metaloproteinase da

matriz 9 (MPM-9), que promove a libertação de um ligante solúvel KIT (sKIT). As metaloproteinases são um grupo de endopeptidases dependentes de zinco com capacidade para degradar a MEC, contribuindo assim para a proliferação, invasão, metástase, angiogénese e progressão da neoplasia. Mais especificamente, a ativação da MPM-9 estimula as células progenitoras, como as CEPs, a deixar o seu nicho quiescente e a mover-se para um ninho vascular proliferativo [6].

O sKIT tem a função de promover a proliferação e a mobilização das CEPs e das células hematopoéticas dentro do microambiente medular e, posteriormente, promove a sua introdução na circulação periférica [7].

O FCEV como já referido desempenha um papel importante na angiogénese, atuando como um potente indutor da permeabilidade vascular e servindo como um mitógeno específico da célula endotelial [17].

Até à data, três recetores de alta afinidade para FCEV foram identificados: KDR, também conhecido como flk-1 (RFCEV-2), Flt-1 ou recetor do fator de crescimento endotelial vascular 1 (RFCEV-1), e Flt-4 ou recetor do fator de crescimento endotelial vascular 3 (RFCEV-3), todos eles recetores de classe III da tirosina cinase que são expressos pelas CEPs circulantes e que, quando estimulados, levam à diferenciação de endotélio tumoral funcional formando os vasos sanguíneos e linfáticos. De todos os recetores para o FCEV, o RFCEV-2 é inegavelmente aquele que é essencial para a vida. Esta declaração é suportada pelo estudo de ratos deficientes em Flk-1 que acabam por morrer na segunda semana de gestação como consequência do desenvolvimento insuficiente de células hematopoiéticas e de CE. O RFCEV-2 é fracamente expresso em tecidos ou células normais, mas a sua sobre-expressão foi relatada em vários tipos de neoplasia, incluindo a do pulmão, cólon, útero, ovário e ainda cancro da mama [18].

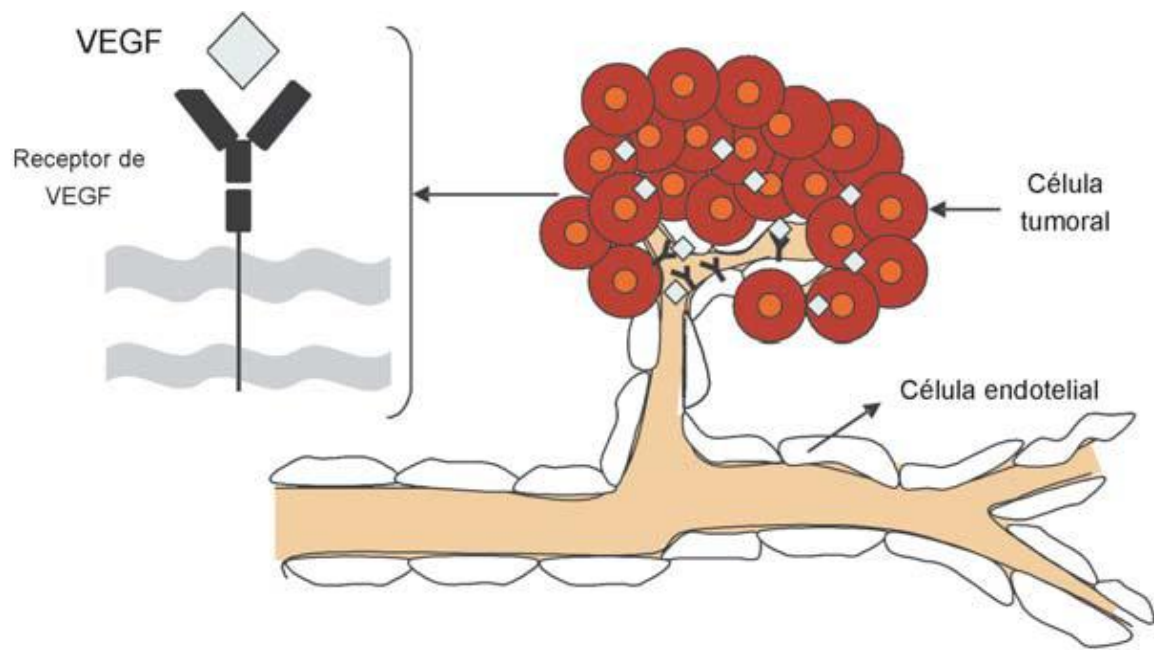
Em diversos estudos, o recetor de RFCEV-2 foi encontrado em níveis moderados/altos em várias linhas celulares neoplásicas. Esta descoberta sugere a possibilidade de uma via autócrina que envolve a atuação do RFCEV nessas células. Uma variedade de tumores malignos, incluindo carcinomas da mama, pulmão e próstata, é conhecida por segregar FCEV. Em geral, os níveis de mRNA e proteína FCEV, em tumores humanos não hematopoiéticos, podem estar relacionados com a progressão maligna. Embora a importância da angiogénese em tumores sólidos esteja bem estabelecida, o seu papel em tumores hematopoiéticos não está [17].

Num estudo de 88 doentes com linfoma não-Hodgkin de células B, foi encontrado um aumento da DMV nos gânglios linfáticos, que estava relacionado com a severidade da doença. Um estudo, semelhante, de leucemia linfocítica aguda infantil também revelou um aumento da DMV, avaliado por coloração com antigénio relacionado com o fator VIII, na MO de doentes leucémicos em comparação com o grupo controlo. No caso do MM, o aumento da DMV na MO também foi observado em diversos doentes em comparação a doentes com GMSI. Estas descobertas, embora não conclusivas, sugerem um papel importante dos fatores de crescimento angiogénicos nas neoplasias hematopoiéticas [17].

Deste modo, é possível que as células endoteliais possam, em resposta a fatores angiogénicos, libertar citocinas capazes de suportar o crescimento tumoral. Estas descobertas revelam que o FCEV pode aumentar o nível de expressão de vários fatores de crescimento com efeitos estimuladores conhecidos nas neoplasias hematopoiéticas. Curiosamente, o fator estimulante de colónias grânulo-monocíticas (FEC-GM) e o fator estimulante da colónia dos granulócitos (FEC-G) têm demonstrado estimular as células endoteliais humanas *in vitro* para migrar e proliferar. Em modelos animais com outro tipo de tumores, a sobre-expressão de FCEV e de FCFb resulta num crescimento rápido do tumor e aumento da vascularização. Após o bloqueio dessas citocinas observa-se uma redução na angiogénese e necrose tumoral, indicando um papel central do FCEV e FCFb na angiogénese tumoral [16].

A produção do FCEV decorre do estímulo direto da IL-6 produzida pelas células do estroma, proporcionando a sobrevivência dos plasmócitos neoplásicos [7].





**Figura 5-** Ação do fator de crescimento do endotélio vascular na neoformação vascular tumoral. Retirado de [7]. FCEV- Fator de crescimento endotelial vascular. *VEGF- Vascular endothelial growth factor*

## 9. Patologia hemato-oncológica

### 9.1 Classificação da Organização Mundial de Saúde dos tumores do tecido hematopoiético e linfático

A classificação de 2008 da Organização Mundial da Saúde (OMS) dos tumores do tecido hematopoiético e linfático era a diretriz estabelecida para o diagnóstico de doenças malignas hematológicas. No entanto, houve grandes melhorias com importantes implicações clínicas e biológicas em 2016 por ter havido uma revisão dessa mesma classificação (Tabela 1).

**Tabela 1-** Tumores do tecido hematopoiético e linfático. Classificação OMS (2016). Retirado de [29].

<b>Mature B-cell neoplasms</b>	<b>Mature T and NK neoplasms</b>
Chronic lymphocytic leukemia/small lymphocytic lymphoma	T-cell prolymphocytic leukemia
Monoclonal B-cell lymphocytosis*	T-cell large granular lymphocytic leukemia
B-cell prolymphocytic leukemia	<i>Chronic lymphoproliferative disorder of NK cells</i>
Splenic marginal zone lymphoma	Aggressive NK-cell leukemia
Hairy cell leukemia	Systemic EBV <sup>+</sup> T-cell lymphoma of childhood*
<i>Splenic B-cell lymphoma/leukemia, unclassifiable</i>	Hydroa vacciniforme-like lymphoproliferative disorder*
<i>Splenic diffuse red pulp small B-cell lymphoma</i>	Adult T-cell leukemia/lymphoma
<i>Hairy cell leukemia-variant</i>	Extranodal NK-/T-cell lymphoma, nasal type
Lymphoplasmacytic lymphoma	Enteropathy-associated T-cell lymphoma
Waldenström macroglobulinemia	Monomorphic epitheliotropic intestinal T-cell lymphoma*
Monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS), IgM*	<i>Indolent T-cell lymphoproliferative disorder of the GI tract*</i>
μ heavy-chain disease	Hepatosplenic T-cell lymphoma
γ heavy-chain disease	Subcutaneous panniculitis-like T-cell lymphoma
α heavy-chain disease	Mycosis fungoides
Monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS), IgG/A*	Sézary syndrome
Plasma cell myeloma	Primary cutaneous CD30 <sup>+</sup> T-cell lymphoproliferative disorders
Solitary plasmacytoma of bone	Lymphomatoid papulosis
Extraosseous plasmacytoma	Primary cutaneous anaplastic large cell lymphoma
Monoclonal immunoglobulin deposition diseases*	Primary cutaneous γδ T-cell lymphoma
Extranodal marginal zone lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue (MALT lymphoma)	<i>Primary cutaneous CD8<sup>+</sup> aggressive epidermotropic cytotoxic T-cell lymphoma</i>
Nodal marginal zone lymphoma	<i>Primary cutaneous acral CD8<sup>+</sup> T-cell lymphoma*</i>
<i>Pediatric nodal marginal zone lymphoma</i>	<i>Primary cutaneous CD4<sup>+</sup> small/medium T-cell lymphoproliferative disorder*</i>
Follicular lymphoma	Peripheral T-cell lymphoma, NOS
In situ follicular neoplasia*	Angioimmunoblastic T-cell lymphoma
Duodenal-type follicular lymphoma*	<i>Follicular T-cell lymphoma*</i>
Pediatric-type follicular lymphoma*	<i>Nodal peripheral T-cell lymphoma with TFH phenotype*</i>
<i>Large B-cell lymphoma with IRF4 rearrangement*</i>	Anaplastic large-cell lymphoma, ALK <sup>+</sup>
Primary cutaneous follicle center lymphoma	Anaplastic large-cell lymphoma, ALK <sup>-</sup>
Mantle cell lymphoma	<i>Breast implant-associated anaplastic large-cell lymphoma*</i>
In situ mantle cell neoplasia*	<b>Hodgkin lymphoma</b>
Diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL), NOS	Nodular lymphocyte predominant Hodgkin lymphoma
Germinal center B-cell type*	Classical Hodgkin lymphoma
Activated B-cell type*	Nodular sclerosis classical Hodgkin lymphoma
T-cell/histiocyte-rich large B-cell lymphoma	Lymphocyte-rich classical Hodgkin lymphoma
Primary DLBCL of the central nervous system (CNS)	Mixed cellularity classical Hodgkin lymphoma
Primary cutaneous DLBCL, leg type	Lymphocyte-depleted classical Hodgkin lymphoma
EBV <sup>+</sup> DLBCL, NOS*	<b>Posttransplant lymphoproliferative disorders (PTLD)</b>
<i>EBV<sup>+</sup> mucocutaneous ulcer*</i>	Plasmacytic hyperplasia PTLD
DLBCL associated with chronic inflammation	Infectious mononucleosis PTLD
Lymphomatoid granulomatosis	Florid follicular hyperplasia PTLD*
Primary mediastinal (thymic) large B-cell lymphoma	Polymorphic PTLD
Intravascular large B-cell lymphoma	Monomorphic PTLD (B- and T-/NK-cell types)
ALK <sup>+</sup> large B-cell lymphoma	Classical Hodgkin lymphoma PTLD
Plasmablastic lymphoma	<b>Histiocytic and dendritic cell neoplasms</b>
Primary effusion lymphoma	Histiocytic sarcoma
<i>HHV8<sup>+</sup> DLBCL, NOS*</i>	Langerhans cell histiocytosis
Burkitt lymphoma	Langerhans cell sarcoma
<i>Burkitt-like lymphoma with 11q aberration*</i>	Indeterminate dendritic cell tumor
High-grade B-cell lymphoma, with <i>MYC</i> and <i>BCL2</i> and/or <i>BCL6</i> rearrangements*	Interdigitating dendritic cell sarcoma
High-grade B-cell lymphoma, NOS*	Follicular dendritic cell sarcoma
B-cell lymphoma, unclassifiable, with features intermediate between DLBCL and classical Hodgkin lymphoma	Fibroblastic reticular cell tumor
	Disseminated juvenile xanthogranuloma
	Erdheim-Chester disease*

**Tabela 2-** Classificação da OMS de Neoplasias Mielóides e Leucemias Agudas. Retirado de [30].

MPN	Myeloid neoplasms with germ line predisposition	Acute leukemias of ambiguous lineage
Chronic myeloid leukemia, BCR-ABL1 <sup>+</sup>	AML and related neoplasms	Acute undifferentiated leukemia
Chronic neutrophilic leukemia	AML with recurrent genetic abnormalities	MPAL with t(8;22)(q34.1;q11.2); BCR-ABL1
Polycythemia vera	AML with t(8;21)(q22;q22.1); RUNX1-RUNX1T1	MPAL with t(1;11)(p23.3); KMT2A rearranged
PMF	AML with inv(16)(p13.1;q22) or t(16;16)(p13.1;q22); CBFB-MYH11	MPAL, B/myeloid, NOS
PMF, prefibrotic/early stage	Acute promyelocytic leukemia with PML-RARA	MPAL, T/myeloid, NOS
PMF, overt fibrotic state	AML with t(9;11)(p21.3;q23.3); MLLT3-KMT2A	B-lymphoblastic leukemia/lymphoma
Essential thrombocythemia	AML with t(8;9)(p23;q34.1); DEK-NUP214	B-lymphoblastic leukemia/lymphoma, NOS
Chronic eosinophilic leukemia, NOS	AML with inv(3)(q21.3;q26.2) or t(3;3)(q21.3;q26.2); GATA2, MECOM	B-lymphoblastic leukemia/lymphoma with recurrent genetic abnormalities
Mastocytosis	AML (megakaryoblastic) with t(1;22)(p13.3;q13.3); RBM15-MKL1	B-lymphoblastic leukemia/lymphoma with t(8;22)(q34.1;q11.2); BCR-ABL1
Myeloid/lymphoid neoplasms with eosinophilia and rearrangement of PDGFRA, PDGFRB, or FGFR1, or with PCM1-JAK2	Provisional entity: AML with BCR-ABL1	B-lymphoblastic leukemia/lymphoma with t(1;11)(p23.3); KMT2A rearranged
Myeloid/lymphoid neoplasms with PDGFRA rearrangement	AML with mutated NPM1	B-lymphoblastic leukemia/lymphoma with t(12;21)(p13.2;q22.1); ETV6-RUNX1
Myeloid/lymphoid neoplasms with PDGFRB rearrangement	AML with biallelic mutations of CEBPA	B-lymphoblastic leukemia/lymphoma with hyperdiploidy
Myeloid/lymphoid neoplasms with FGFR1 rearrangement	Provisional entity: AML with mutated RUNX1	B-lymphoblastic leukemia/lymphoma with hypodiploidy
Provisional entity: myeloid/lymphoid neoplasms with PCM1-JAK2 rearrangement	AML with myelodysplasia-related changes	B-lymphoblastic leukemia/lymphoma with t(5;14)(q31.1;q32.3); IL3-IGH
MDS/MPNs	Therapy-related myeloid neoplasms	B-lymphoblastic leukemia/lymphoma with t(1;19)(q23;p13.3); TCF3-PBX1
Chronic myelomonocytic leukemia	AML, NOS	Provisional entity: B-lymphoblastic leukemia/lymphoma, BCR-ABL1-like
Atypical chronic myeloid leukemia, BCR-ABL1 <sup>+</sup>	AML with minimal differentiation	Provisional entity: B-lymphoblastic leukemia/lymphoma with IAMP21
Juvenile myelomonocytic leukemia	AML without maturation	T-lymphoblastic leukemia/lymphoma
MDS/MPN with ring sideroblasts and thrombocytosis	AML with maturation	Provisional entity: early T-cell precursor lymphoblastic leukemia
MDS/MPN, unclassifiable	Acute myelomonocytic leukemia	Provisional entity: natural killer cell lymphoblastic leukemia/lymphoma
MDS	Acute monoblastic/monocytic leukemia	
MDS with single lineage dysplasia	Pure erythroid leukemia	
MDS-RS	Acute megakaryoblastic leukemia	
MDS-RS with single lineage dysplasia	Acute basophilic leukemia	
MDS-RS with multilineage dysplasia	Acute panmyelosis with myelofibrosis	
MDS with multilineage dysplasia	Myeloid sarcoma	
MDS with excess blasts	Myeloid proliferations related to Down syndrome	
MDS with isolated del(5q)	Transient abnormal myelopoiesis	
MDS, unclassifiable	Myeloid leukemia associated with Down syndrome	
Provisional entity: refractory cytopenia of childhood	Blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasm	

Note: Provisional entities are italicized. New or renamed entities are in red. MLL has been renamed KMT2A. The inv(3)(q21.3;q26.2) or t(3;3)(q21.3;q26.2) does not represent a fusion gene, but repositions GATA2 to activate MECOM expression and confer GATA2 haploinsufficiency. Abbreviations: AML, acute myeloid leukemia; MDS, myelodysplastic syndromes; MPN, myeloproliferative neoplasms; MDS-RS, MDS with ring sideroblasts; MPAL, mixed phenotype acute leukemia; NOS, not otherwise specified; PMF, primary myelofibrosis.

## 9.2 Mieloma Múltiplo

O mieloma múltiplo (MM) é uma patologia hematológica que é caracterizada por uma proliferação clonal de células plasmáticas, ou células linfóides B diferenciadas, que secretam

Igs, resultando numa variedade de manifestações clínicas, incluindo lesões osteolíticas, anemia, hipercalcemia e insuficiência renal [6].

É, predominantemente, uma doença dos idosos, com idade média de diagnóstico de 69 anos. Por definição, assume-se que estamos na presença de MM quando o acúmulo de células monoclonais plasmáticas é  $> 10\%$  [12].

Antes de 1997, a sobrevivência média dos doentes diagnosticados com MM era de aproximadamente 2,5 anos. De 1997 a 2006, o uso de altas doses de terapia antineoplásica, o transplante de células estaminais e o desenvolvimento de novos fármacos aumentaram a média de sobrevivência global para quase 4 anos, uma melhoria de 50%. Nalguns casos de doentes que estão, atualmente, a receber tratamento com os novos fármacos houve ausência de recaídas aumentando para mais de 10 anos o intervalo sem recidivas. Na maioria das vezes, o MM é precedido por uma doença pré-maligna conhecida como GMSI [12]. Esta fase precoce da doença é considerada uma fase avascular, uma vez que o desenvolvimento de vasos sanguíneos está ausente, ocorrendo apenas no MM. A GMSI afeta 2% da população acima dos 50 anos e progride para MM a uma taxa de 1% por ano [6]. O evento que diferencia a GMSI do MM é o aparecimento de lesões osteolíticas [18]. A transição biológica das células plasmáticas normais para GMSI é consistente com o desenvolvimento de muitos eventos oncogénicos. Como exemplo, temos um evento inicial descrito na GMSI, bem como no MM que é adesregulação de um gene da ciclina D e as translocações secundárias, às vezes envolvendo um locus de Ig [12].

Os principais motivos da transformação maligna são a hiperdiploidia, translocação entre Ig de cadeia pesada (IgH) e oncogenes e, ainda, a ativação da mutação e/ou deleção dos oncosuppressores [20].

Além dos eventos oncogénicos, a angiogénese na MO e as citocinas relacionadas à doença óssea do mieloma podem desempenhar um papel na progressão da GMSI para o MM [6].

### **9.2.1 Células endoteliais progenitoras como um novo potencial biomarcador**

De acordo com o National Cancer Institute (NCI), um biomarcador é uma molécula encontrada no sangue e outros fluidos corporais ou tecidos que podem servir como indicador para um processo normal ou anormal, uma condição, ou doença [21].



No ano de 1960, pesquisadores do MM começaram a identificar biomarcadores que eram preditores independentes de sobrevivência, incluindo a hemoglobina, o cálcio sérico, a creatinina sérica e a gravidade da lesão óssea. Em 1975, Durie e Salmon introduziram um sistema de teste que usava proteína M, hemoglobina, cálcio e uma série de lesões ósseas para prever a carga tumoral das células do MM. Na década de 80, a microglobulina- $\beta_2$  sérica ( $\beta_2$ M) foi considerada um marcador de prognóstico simples, ainda que confiável, para a classificação da doença [21].

Devido à mesma origem das CEPs e das células plasmáticas precursoras de MM, as CEHs, pensou-se que se poderia caracterizar a CEPs como um novo biomarcador para o MM.

No entanto, parece haver falta de informações significativas sobre a quantidade de CEPs na MO nos diferentes estádios do MM, já que a maioria dos estudos se concentra em CEPs de SP.

### **9.2.2 A utilidade das células endoteliais progenitoras no mieloma múltiplo**

Existem estudos que mostraram que os níveis de CEPC são maiores no MM do que nos controlos saudáveis. Estas foram correlacionadas com os níveis de proteína M e de microglobulina- $\beta_2$ , sugerindo que as CEPCs podem constituir um biomarcador periférico para a progressão de MM. Mesmo em estádios iniciais de MM, a mobilização e a proliferação de CEPs na MO são substanciais em comparação com os grupos saudáveis e revelam que as CEPCs já estão aumentadas antes da doença ativa.

Uma vez que diferentes respostas à terapia estão associadas a diferentes níveis de CEPs, esses níveis podem vir a ser usados para prever a resposta dos doentes ao tratamento e prever qual a opção de tratamento melhor para determinada situação.

## **9.3 Síndrome mielodisplásica**

As síndromes mielodisplásicas (SMD) são um grupo de doenças hematopoiéticas clonais heterogêneas caracterizadas por uma hematopoiese ineficaz e tendência a evoluir para leucemias agudas. Esses distúrbios clonais são caracterizados por uma maior celularidade da

MO, devido à excessiva apoptose geral, ocorrem citopénias periféricas, assim como ocorreu uma aberrante diferenciação de células. Embora as SMD constituam um grupo muito heterogéneo de doenças, todas elas partilham diversos graus de hematopoiese ineficaz e suscetibilidade à transformação leucémica. A transformação da SMD para LMA é um resultado da evolução desse processo, com ocorrência de hipermetilação, silenciamento de genes supressores tumorais e ativação de oncogenes [22]. A morfologia aberrante das células displásicas reflete defeitos funcionais, o que significativamente afeta o curso da doença mesmo em doentes com baixo risco de evolução para leucemia. De facto, doentes com SMD são propensos a infeções graves mesmo quando a contagem de neutrófilos é aparentemente normal e, podem ter graves episódios hemorrágicos mesmo tendo razoáveis números de plaquetas. Em geral, os doentes têm uma resposta transitória e inadequada à quimioterapia, provavelmente como resultado do estado "latente" das CEH da SMD dentro dos nichos protetores da MO. Portanto, é concebível que os nichos possam contribuir para o comportamento biológico da SMD.

### **9.3.1 A angiogénese na síndrome mielodisplásica**

Como em outras doenças malignas hematológicas, também na SMD, foi observado um aumento da angiogénese na MO. Deste modo, estudos imuno-histoquímicos têm evidenciado uma DMV aumentada em comparação a indivíduos saudáveis.

Os resultados observados que levam à correlação entre a DMV e o estadió da doença têm fornecido provas contraditórias. Na verdade, alguns estudos relatam uma DMV mais alta, preferencialmente em doentes de alto risco, enquanto outros estudos não conseguiram encontrar qualquer correlação. Da mesma forma, o prognóstico de doentes com SMD tendo em conta a DMV ainda não se encontra clarificado.

### **9.3.2 Influência das células endoteliais progenitoras na caracterização da síndrome mielodisplásica**

Alguns estudos recentes têm explorado as CECs e CEPs na SMD. Uma vez que os progenitores endoteliais demonstraram contribuir para a microvasculatura da MO, Teofili e col. [23] usaram as CFCEs como modelo para replicar o nódulo vascular da MO. Isolaram as CFCEs de um grupo homogêneo de doentes diagnosticados com SMD de baixo risco e avaliaram a influência do endotélio, em doentes com SMD, na diferenciação de células hematopoiéticas normais. Dado que a metilação aberrante de ADN de promotores ricos em porções do ADN cujo nucleótido de citosina é seguido por um nucleótido de guanina na sequência linear de bases ao longo da direção 5' → 3', é muito frequente na SMD, investigou-se a eventual presença de fenómenos de desregulação da maquinaria epigenética das CFCEs. O estudo de Teofili e col. [23] demonstrou que as células progenitoras endoteliais que são isoladas de doentes com SMD de baixo risco não suportam adequadamente a hematopoiese, particularmente na diferenciação de células mielóides e megacariócitos. Os resultados forneceram evidências de que o número de CECs e CFECs está consistentemente aumentado nas SMDs e que, para além disso, as CFECs derivadas da SMD exibem várias anormalidades epigenéticas. Após análise de 20 amostras obtidas de doentes, observou-se a presença de metilação de quatro genes que frequentemente sofrem hipermetilação em células hematopoiéticas da SMD: p15INK4b (p15), DAPK1, CDH1 e SOCS1. Também se descobriu que, todos os doentes, apresentaram pelo menos um gene hipermetilado, sendo que 13 doentes mostraram ter múltiplos genes hipermetilados. Todos os genes investigados são importantes genes funcionais para as funções das células endoteliais normais, excluindo deste modo que a hipermetilação possa resultar do silenciamento de genes fisiológicos. Como prova, nenhuns dos 14 indivíduos saudáveis avaliados apresentaram genes hipermetilados [23].

## **9.4 Síndromes mieloproliferativas**

As síndromes mieloproliferativas crônicas são um conjunto de doenças resultantes da expansão clonal das células hematopoiéticas multipotentes que originam a proliferação descontrolada de uma ou mais linhas celulares, nomeadamente da linha mielóide, da eritróide ou da megacariocítica [24].

### **9.4.1 Leucemia mielóide aguda**

A leucemia mieloide aguda (LMA) é uma doença geneticamente heterogênea definida pela acumulação de alterações genéticas adquiridas em células progenitoras hematopoiéticas que vão perturbar os mecanismos normais de crescimento celular, proliferação e diferenciação. Nos últimos anos, houve uma maior compreensão do papel da angiogénese na progressão da LMA [25].

O tratamento, potencialmente curativo, consiste na quimioterapia intensiva e, também, no transplante alogénico em alguns casos selecionados. No entanto, mesmo em doentes a receber tratamento, o prognóstico continua a ser mau, estando a sobrevivência média global de 5 anos, abaixo de 60%, na maioria dos casos, independentemente das anomalias citogenéticas existentes. Além da alta taxa de mortalidade dos doentes com LMA, os regimes terapêuticos intensivos estão associados a efeitos adversos graves, afetando particularmente a MO. Com a presença da doença leucémica subjacente associada à administração de maioria dos medicamentos citotóxicos ocorrem, invariavelmente, efeitos inibitórios da atividade normal hematopoiética da MO. Consequentemente, a maioria dos doentes com LMA têm propensão para a anemia, infeções e sangramento.

Há estudos que sugerem que certas citocinas podem ter efeitos negativos sobre as células hematopoiéticas normais como por exemplo, a elevação do fator de necrose tumoral, de citocinas pró-inflamatórias, em certas leucemias e a supressão da hematopoiese normal na MO.



#### **9.4.1.1 Estudo das células endoteliais progenitoras como biomarcador na leucemia mielóide aguda**

Dada a importância da angiogénese em oncologia, as CECs e as CEPs, para além de serem potenciais alvos de tratamento, são candidatas promissoras como marcadores de progressão da doença. Existem estudos em que as CECs e CEPs foram quantificadas em doentes com LMA em fase de diagnóstico inicial e após a indução de quimioterapia e posteriormente relacionadas com a resposta dos doentes ao tratamento. Nesse estudo, foram incluídos 40 doentes com LMA e 20 controlos saudáveis, com idades e géneros semelhantes. As CECs e CEPs foram avaliadas por citometria de fluxo tanto na fase de diagnóstico assim como após a indução de quimioterapia [25].

Em diversos estudos, tanto os níveis de CEC quanto de CEPs foram maiores em doentes com LMA do que no grupo controlo, tanto no diagnóstico como após a indução de quimioterapia, o que pode indicar que a angiogénese pode ter um papel na manutenção da LMA. Foi também observado que os níveis de CECs e CEPs, em doentes com LMA, diminuíram após a indução de quimioterapia em comparação com os níveis existentes antes do tratamento, mas os níveis continuaram a ser maiores do que os do grupo controlo. Esta redução nos níveis de CECs e CEPs podem suportar a relevância clínica dessas células na redução da massa tumoral [26].

Os níveis mais baixos de CECs e CEPs em doentes que obtiveram resposta completa (RC) em comparação com doentes que não atingiram RC na fase de diagnóstico ou após o tratamento indicam que os níveis de CECs e CEPs podem ser usados para detetar a resposta ao tratamento e podem ser usados para refletir o nível de doença residual mínima (DRM) da LMA [25].

Embora, as CEPs estejam indicadas como futuros promissores biomarcadores da doença, outras investigações são necessárias para determinar melhor o valor preditivo e a implicação dessas células na gestão de LMA [25].

#### **9.4.2 Leucemia mielóide crónica**

A leucemia mielóide crónica (LMC) é caracterizada pela presença de uma alteração genética adquirida, denominada, cromossoma Filadélfia, envolvendo a translocação entre os cromossomas 9 e 22. A nível molecular, a fusão destes diferentes cromossomas é chamada de BCR-ABL. As principais causas para esta anomalia são em geral, desconhecidas. Na minoria dos casos, a doença pode estar relacionada com a exposição à radiação. Na LMC, em contraste com a LMA, as células anormais geralmente funcionam adequadamente, permitindo um curso inicial mais suave da doença, em comparação com os casos agudos [26]. As alterações na adesão destas células à matriz extracelular da MO têm sido propostas como uma das causas que justificariam a presença de células blásticas leucémicas no SP. A fisiopatologia desta doença é em grande medida ditada pela expressão e pela atividade biológica da proteína quimérica BCR-ABL. A crise blástica é considerada a última fase evolutiva da doença, onde o número de células blásticas é superior a 20% na MO ou no SP. Em aproximadamente 25% dos doentes nesta fase, a manifestação clínica ocorre de modo semelhante à LLA, enquanto nos 75% restantes, a manifestação se assemelha a LMA [26].

##### **9.4.2.1 Descoberta do gene fusão BCR-ABL nas células endoteliais**

Vários estudos realizados na LMC sugerem que as CEs dos doentes com LMC podem pertencer ao clone leucémico. Assim, alguns pesquisadores forneceram provas sobre a presença da transcrição do BCR-ABL de fusão nas CEs derivadas *in vitro* das células progenitoras da MO. Estas descobertas foram confirmadas pela evidência de que a LMC se origina de uma célula progenitora hemangioblástica derivada da MO capaz de gerar células sanguíneas e células endoteliais [5].

Estudos subsequentes forneceram resultados conflitantes uma vez que se isolaram células CD31<sup>+</sup>/CD105<sup>+</sup> da MO de seis doentes com LMC e mostrou que a maioria dessas células exibem a transcrição BCR-ABL, enquanto noutros estudos se incubou células endoteliais *in vitro* de 19 doentes com LMC e não se conseguiu detetar BCR-ABL transcrito nestas CEs geradas *in vitro* a partir de CEPC. Com o isolamento de células RFCEV-2<sup>+</sup> da MO de doentes com LMC houve evidências de que essas células expressam a transcrição do gene fusão e são

capazes de gerar CEs *in vitro*. Mais ainda, conseguiu-se mostrar que as células RFCEV-2<sup>+</sup> CD34<sup>-</sup> na MO destes doentes podem atuar como células progenitoras multipotentes, gerando também CEs. Essas evidências representam apenas uma preliminar sugestão e provas mais definitivas parecem ser necessárias para demonstrar definitivamente que as CEs pertencem ao clone leucémico na LMC [5].

Vários mecanismos bioquímicos podem ser responsáveis pela ativação de uma resposta neoangiogénica na LMC e esses mecanismos estão aparentemente relacionados com a secreção de moléculas proangiogénicas pelas células leucémicas. Estudos recentes indicam que as células da LMC libertam vesículas extracelulares capazes de estimular o processo de vascularização por células endoteliais vasculares humanas, estimulando a expressão de moléculas de adesão, a molécula de adesão intercelular-1 (MAI-1) e molécula de adesão celular vascular-1 (MACV-1) [5].

### **9.5 Leucemia linfocítica aguda na criança**

A leucemia linfocítica aguda (LLA) é uma doença heterogénea, caracterizada pela proliferação de células jovens (blastos), sendo considerada altamente agressiva. Na LLA, ocorre proliferação descontrolada de linfoblastos (origem B ou T) na MO, sangue periférico, e / ou em outros órgãos. A LLA é o tipo de cancro infantil mais comum e, em adultos, possui uma importante causa de mortalidade. Nos últimos anos, houve grandes avanços na compreensão da base genética da LLA. Os estudos de caracterização genómica, incluindo a análise de microarranjos e sequenciação do genoma, ajudaram a identificar inúmeras mutações presentes na LLA [26].

A medição de CEC e de CEPCs tem a vantagem de ser relativamente menos invasiva e viável. Além disso, representam o somatório de todos os efeitos de vários fatores pró-angiogénicos e antiangiogénicos.

O interesse da contagem CEPC nos doentes com LLA na infância é de comprovar seu papel na angiogénese e correlacioná-las com os dados clínicos, hematológicos e com a resposta à terapia para a poder avaliar a sua capacidade como marcador de prognóstico. Em estudos recentes, descobriu-se que a contagem CEPC foi estatisticamente e significativamente maior

em crianças com LLA do que no grupo controlo e é visível uma correlação positiva entre as CEPC e a taxa de contagem leucocitária total (CLT) no grupo de doentes de alto risco.

As CEPCs foram detetadas com maior frequência no SP e nos tumores de doentes com maior estadio invasivo da doença ou na recidiva, indicando um possível envolvimento na progressão tumoral e metástase. Encontrou-se uma diferença estatisticamente significativa de acordo com a resposta à terapia; sendo que uma maior contagem de CEPCs foi associada a uma má resposta à terapia de indução e a uma maior taxa de recidiva. Muitos estudos revelaram que as CEPC determinam a sensibilidade dos tumores tanto aos fatores antiangiogénicos como à quimioterapia padrão.

Uma das maiores esperanças para o estudo das CEPCs é o seu potencial uso na terapia cancerígena como veículos celulares para a entrega de genes suicidas, toxinas ou moléculas antiangiogénicas [27].

Concluindo, a contagem de CEPCs é maior nas crianças com LLA e o seu nível está associado a uma CLT maior, uma fraca resposta à terapia e a uma maior taxa de recaída [27].

## **9.6 Leucemia linfocítica crónica B**

Diferentes investigadores observaram que existe um aumento de CEC em diferentes doenças hematológicas, sendo uma destas doenças a leucemia linfocítica crónica B (LLC-B).

A LLC-B é uma neoplasia de linfócitos B clonais que conduz à acumulação de pequenos linfócitos B maduros na MO, no SP e nos tecidos linfóides. Nos países ocidentais a LLC-B é a forma leucémica mais comum e afeta mais os homens do que as mulheres, normalmente por volta dos 70-79 anos de idade. Vários estudos demonstraram que a angiogénese está aumentada na LLC-B havendo um aumento significativo da vascularidade da MO e dos nódulos linfáticos. Além destas observações também foi descrito nos doentes com LLC-B um aumento dos diferentes fatores angiogénicos como o FCEV e FBCEV. Tendo em consideração estas observações, a inclusão de um grupo de doentes com LLC-B em estudos pode constituir um grupo que garanta a deteção e estudo das CEC [24].

As células linfóides da LLC podem acumular-se *in vivo* e permanecer na fase G0/G1 do ciclo celular indefinidamente, porém morrem rapidamente por apoptose *in vitro* na ausência de

determinados fatores humorais e celulares presentes *in vivo*. As CEs podem prolongar a viabilidade destas células B, tendo em conta que a forma dimérica da IL-6 produzida pelas CEs impede as células da LLC-B entrem em apoptose com uma taxa de redução de até 50% quando comparado com o grupo controlo [7].

### **9.7 Linfoma não-Hodgkin**

A contribuição das CEPs para a formação de novos vasos mostrou ser particularmente relevante em modelos de linfoma. Com base nesses factos, alguns estudos têm procurado definir a presença de características moleculares e qual a relevância clínica das CEPs em doentes com linfoma, tendo em vista a possibilidade de obtenção de amostras de MO, SP e biópsias tumorais. Os linfomas são um dos tipos de tumores em que a contribuição de células derivadas da MO na angiogénese tumoral é maior. Assim, investigou-se no sistema circulante e no local do tumor a presença de CEPs em doentes com linfoma. Com base, também, na acessibilidade da MO, amostras de SP e biópsias do nódulo linfático (NL) do mesmo doente, e sobre a possibilidade de estudar sequencialmente amostras antes e após o tratamento [14].

As CEPs circulantes (CEPC) foram mais frequentes em doentes do que em controlos saudáveis, mais frequentes em doentes jovens do que em doentes mais velhos e em pessoas com linfomas de maior agressividade. Os níveis de CEPCs diminuíram em doentes que apresentaram resposta completa ao tratamento, mas foram sustentados ou aumentados nos que não responderam. Notavelmente, CEPs no NL (CEP-NL) foram mais frequentemente detetadas do que as CEPC sendo que foram detetadas em estruturas vasculares e no estroma e posteriormente isoladas em CEs diferenciadas *in vitro*. A presença de CEP-NL está relacionada com o tamanho da lesão e com aumento da angiogénese em linfomas indolentes. Tanto as CEPC como as CEP-NL compartilham marcadores endoteliais, mas podem ser identificadas e quantificadas separadamente, uma vez que expressam diferentes isoformas de CD133. O perfil de expressão de genes das CEP-NL revelou a expressão de fatores pró-angiogénicos e de crescimento tumoral que podem influenciar o crescimento do linfoma.

Deste modo, podemos concluir que as CEP estão presentes na circulação e em amostras de tumores de doentes com linfoma não-Hodgkin. Como existem relações entre CEPs e várias características do linfoma, as pesquisas têm demonstrado a relevância clínica e biológica de

estudar CEPC e CEP-NL em doentes com linfoma. Contudo, surpreendentemente, a presença e os níveis de CEP-NL não se correlacionam significativamente com o tipo de linfoma, embora tenham sido mais frequentemente detetados em linfomas indolentes, mas correlacionam-se significativamente com uma maior angiogénese no NL, com o tamanho do tumor (lesão) e com o estado clínico dos doentes [14].

### **9.7.1 O perfil da expressão genética das células endoteliais progenitoras do nódulo linfático sugere diferentes papéis no crescimento do linfoma**

Para entender o papel da CEP-NL durante o crescimento do linfoma, tem-se caracterizado, por análise de *Affymetrix microarrays*, o perfil de expressão génica de CEP-NL isoladas e comparou-se com a das CEPC. Globalmente, as CEP-NL expressam níveis mais altos de genes pertencentes a diferentes categorias, como a adesão celular, a sinalização, a angiogénese e quimiocinas e recetores. Para validar alguns dos resultados obtidos com a tecnologia *Affymetrix* estudos realizaram *polimerase chain reaction – real time* para dois genes descritos como altamente expressos nas CEP-NL. Descobriu-se que as CEP-NL expressam um número de genes cujas proteínas resultantes podem, de facto, contribuir para a expansão da massa do linfoma tais como várias proteínas envolvidas na angiogénese, ativação de vias específicas de sinalização e produção de citocinas quimioatratoras. Analisando os dados do perfil de expressão genética das CEP-NL, sugere-se que essas células possuem características moleculares que diferem das CEPC. Além disso, o perfil de expressão de genes identificou vários genes cujas funções resultantes podem contribuir para o crescimento do linfoma e para a angiogénese. Atualmente, está a ser explorada a importância de cada família de genes no processo de crescimento do linfoma e a saída das células de linfoma para o SP [14].

Em suma, a simultânea deteção de CEPC e CEP-NL, e a correlação entre essas duas populações celulares e parâmetros clínicos, revela novos possíveis marcadores que podem ser usados para monitorizar a progressão da doença, agressividade ou a resposta aos tratamentos [14].

## 9.8 Leucemia de células T do adulto

A leucemia de células T do adulto (LTA) foi inicialmente descrita em 1977, no Japão, sendo que o seu agente etiológico foi isolado e designado por vírus linfotrópico humano de células T do tipo 1 (VLHT1). A LTA é uma doença maligna, rara e muito agressiva que se desenvolve após um período de latência num indivíduo infectado pelo VLHT1. A transmissão deste vírus ocorre de várias formas, porém requer o contato direto com linfócitos infectados. A principal forma de transmissão é por via vertical, de mãe para o filho, principalmente pelo leite materno e pelas vias parentérica e sexual. É classificada em quatro subtipos clínicos: *smoldering*, aguda, crônica e linfomatoso. Esta doença, decorre da expansão clonal de linfócitos T CD4<sup>+</sup> infectados e transformados pelo vírus. Clinicamente contempla quatro subtipos de características e evoluções peculiares e os fatores determinantes do seu desenvolvimento permanecem pouco conhecidos; porém sabe-se que a proteína viral Tax está intimamente relacionada com a immortalização das células infectadas pelo VLHT1. A transformação de células T pelo VLHT1 resulta na proliferação clonal contínua de linfócitos T CD4<sup>+</sup> mediada pela Tax. Esta proteína induz a síntese de interleucina 2 (IL-2) e do seu recetor, RIL-2 e bloqueia os genes reparadores de DNA e indutores da apoptose. Durante a sua evolução, as células da LTA invadem os tecidos, sendo esta uma importante característica da doença. Este potencial invasivo deve-se em muito à capacidade de interação das células leucémicas e do endotélio, tendo sido a molécula de adesão E-seletina descrita como a principal mediadora da adesão entre estas [28].

### 9.8.1 O papel do sistema vascular no seu desenvolvimento

Com a descoberta da elevada capacidade adesiva das células transformadas novas vertentes de estudo foram surgindo. Dados sugeriram que a angiogénese poderia ter, aqui, um papel importante na patogénese da LTA. Estudos demonstraram que as células infectadas pelo VLHT1 segregam o FCBb e o FCEV em consequência da ativação da transcrição induzida pela proteína viral Tax. O FCEV induz a diferenciação das CEPs, a sua interação direta com

as células do estroma medular e regula a expansão deste grupo celular intervindo na formação de vasos sanguíneos tumorais funcionais. Evidências sugerem que as CEPs contribuem para a angiogénese tumoral. Deste modo, as CEPs e as CEMs têm sido estudadas como potenciais alvos terapêuticos para o uso de fármacos antiangiogénicos [28].

### **9.8.2 Quantificação de células endoteliais progenitoras em portadores assintomáticos**

Com a finalidade de averiguar a relação entre as CEPs e as CECs, Meireles e col. [29], realizaram um estudo transversal desenvolvido com o objetivo de quantificar as CEPs no sangue de portadores assintomáticos do VLHT1 em comparação com indivíduos saudáveis, por citometria de fluxo. Este estudo tinha como objetivo analisar o perfil das CEPs e validar a hipótese de que as CEPs possam participar nas vias proangiogénicas neste tipo de doença.

Como resultado do estudo, foi encontrado um número aumentado de CEPs no SP de portadores assintomáticos de VLHT1 em comparação com o grupo controlo, o que sugere a existência de atividade angiogénica, a qual pode ser explicada por efeito direto do vírus na regulação da proliferação das células endoteliais via fator de crescimento [28].

Deste modo, podemos concluir que o valor de CEPs poderá vir a ser utilizado como marcador de atividade de doença e aplicado para monitorizar a eficácia antitumoral da terapia antiangiogénica.

## **10. Resultados e discussão**

Nesta monografia, conseguimos consolidar a ideia de que as CEPs possuem um papel ativo em doenças na área da hemato-oncologia, através da consulta de estudos desenvolvidos nos últimos anos que sublinham um papel potencialmente importante de CEPs no controlo da angiogénese e vasculogénese na vida adulta. A quantificação de CEPs é reportada em estudos sobre a fisiopatologia de doenças hematológicas onde se demonstra que as CEPs sofrem alterações na presença de dano tecidual, ativação endotelial e potencial antiangiogénico.



Um aumento da angiogénese é observado em muitos tumores, incluindo doenças malignas hematológicas e sabe-se também que as CEPs desempenham um papel importante na progressão do tumor. Atualmente, são vários os mecanismos que são responsáveis pelo aumento da angiogénese observado nestes tumores, sendo que o recrutamento aumentado de CEPs ao nível do desenvolvimento do tumor na MO é um deles.

Atualmente, a descoberta do aumento da DMV em muitas doenças hematológicas, abriu caminho para a procura de terapias anti-angiogénicas. Contudo, essas terapias, apesar de serem eficazes, na maioria dos doentes ainda não foram capazes de parar a progressão do tumor eficazmente.

Em suma, podemos concluir que o valor de CEPs poderá vir a ser utilizado como marcador de atividade da doença e aplicado para monitorizar a eficácia antitumoral da terapia antiangiogénica num futuro.

## **11. Conclusões e perspetivas futuras**

- Nesta revisão da literatura, podemos concluir que o uso das CEPs nas neoplasias do foro hemato-oncológico podem ser úteis, sendo que na LMA, detetam a eficácia do tratamento antitumoral e refletem o nível de doença residual mínima.
- No caso da LMC, as CEPs têm a capacidade de prever a evolução da LMC para a fase blástica.
- Na SMD, as CEPs apresentam hipermetilação de genes e sintetizam moléculas desequilibradamente.
- Na LLA da criança as CEPs circulantes existem em maior quantidade que nas crianças saudáveis e estão significativamente ligadas a um estado de doença de alto risco e à quimioresistência.
- Na LLC-B, as CEPs podem representar um marcador biológico de agressividade e progressão da doença a ser consideradas para novos tratamentos antiangiogénicos direcionados.
- Nos linfomas não-Hodgkin, estas células podem ser usadas como novos marcadores de progressão da doença, de agressividade ou de resposta à terapia pois a presença das CEPs

incorporadas no nódulos linfáticos está relacionada com o tamanho de lesão e com aumento da angiogénese.

- No linfoma de células T do adulto, as CEPs são úteis como possível biomarcador de ativação e mobilização celular uma vez que as CEPs estão aumentadas nestes doentes.

- No MM, as CEPs prevêm a evolução da GMSI para MM ativo e também contribuem para o “follow up” da terapia.

- Apesar do avanço na identificação e na caracterização das propriedades funcionais das CEPs, a sua biologia celular básica não está ainda definida e o seu papel fisiológico ainda continua a ser objeto de debate.

- Uma melhor compreensão dos mecanismos responsáveis pela angiogénese é necessária para definir uma estratégia eficiente para inibir a angiogénese tumoral mediada pelas CEPs.

- Em estudos futuros, é fundamental determinar um alvo ideal, para as novas terapias, para que se possa definir subpopulações de doentes e determinar marcadores biológicos de evolução clínica para que se possa direcionar a terapêutica específica, sendo que, o pressuposto básico desses estudos é a inibição da angiogénese que pode levar à melhora da resposta das células neoplásicas ao padrão da quimioterapia e outras terapêuticas existentes e, à maior sobrevivência dos doentes.

## 12. Referências Bibliográficas

1. Zhang, S.-H.; Xiang, P.; Wang, H.-Y.; Lu, Y.-Y.; Luo, Y.-L.; Jiang, H. The Characteristics of Bone Marrow-Derived Endothelial Progenitor Cells and Their Effect on Glioma. *Cancer Cell Int.* (2012), 12
2. Peichev, M.; Naiyer, a J.; Pereira, D.; Zhu, Z.; Lane, W. J.; Williams, M.; Oz, M. C.; Hicklin, D. J.; Witte, L.; Moore, M. a; e col. Expression of VEGFR-2 and AC133 by Circulating Human CD34(+) Cells Identifies a Population of Functional Endothelial Precursors. *Blood* (2000), 95, 952–958
3. Yoder, M. C. Human Endothelial Progenitor Cells. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* (2012), 2, 1–14
4. Macías-Abraham, C. C.; Valle-Pérez, L. O.; Hernbandéz-Ramírez, P.; Ballester-Santovenia. Características fenotípicas y funcionales de las células madre mesenquimales y endoteliales. *Revista Cubana de Hematología, Inmunología y Hemoterapia* (2010) 26(4), 256-275
5. Testa, U., Saulle, E.; Castelli, G.; Pelosi, E. Endothelial progenitor cells in hematologic malignancies. *StemCellInvesting* (2016) 3:26, 1-12
6. Tenreiro, M. M.; Correia, M.. L.; Brito, M. A. Endothelial progenitor cells in multiple myeloma neovascularization: a brick to the wall. *Springer Science* (24Agosto 2017)
7. Pereira, J.; Meireles, A. L. P.; Godoy, C. R. T.; Chamone, D. A. F. Papel da célula endotelial em neoplasias malignas hematológicas. *Rev. bras. hematol. hemoter.* (2008) 30(3), 223-228
8. Pessoa, B. S. Células Endoteliais Progenitoras: uma terapia possível? *Rev Bras Cardiol.* (2011) 24 (2), 122-124
9. Fadini, G. P.; Baesso, I.; Albiero, M.; Sartore, S.; Agostini, C.; Avogaro, A. Technical Notes on Endothelial Progenitor Cells: Ways to Escape from the Knowledge Plateau. *Atherosclerosis* (2008), 197, 496–503

10. Asahara, T.; Murohara, T.; Sullivan, A.; Silver, M.; van der Zee, R.; Li, T., e col. Isolation of Putative Progenitor Endothelial Cells for Angiogenesis. *Science* 1997, 275, 964-967
11. Quirici N.; Soligo D.; Caneva, L.; Servida, F.; Bossolasco, P.; Deliliers GL e col. Differentiation and expansion of endothelial cells from human bone marrow CD133<sup>+</sup> cells. *Maggiore O* (2001) Br J Haematol 115, 189-194
12. Manier, S.; Sacco, a.; Leleu, X.; Ghobrial, I. M.; Roccaro, a. M. Bone Marrow Microenvironment in Multiple Myeloma Progression. *J. Biomed. Biotechnol.* (2012)
13. Dreyfuss, J. L.; Oliveira, J. S. R. Matriz extracelular e enzimas degradatórias na hematopoese e doenças onco-hematológicas. *Rev. Bras. Hematol. Hemoter.* (2008) 30(5), 398-405
14. Igreja, C.; Courinha, M.; Cachaço, A. S.; Pereira, T.; Cabeçadas, J.; Silva, M. G. e col. Characterization and clinical relevance of circulating and biopsy-derived endothelial progenitor cells in lymphoma patients. *Haematologica* (2007); 92. 469-477
15. Rehman, J.; Li, J.; Orschell, C. M.; March, K. L. Peripheral Blood “Endothelial Progenitor Cells” Are Derived from Monocyte/macrophages and Secrete Angiogenic Growth Factors. *Circulation* (2003), 107, 1164–1169
16. Kumar, S.; Witzig, T. E.; Timm, M.; Haug, J.; Wellik, L.; Kimlinger, T. K.; Greipp, P. R.; Rajkumar, S. V. Bone Marrow Angiogenic Ability and Expression of Angiogenic Cytokines in Myeloma: Evidence Favoring Loss of Marrow Angiogenesis Inhibitory Activity with Disease Progression. *Blood* (2004), 104, 1159–1165
17. Bellamy, W. T.; Richter, L.; Frutiger, Y.; Grogan, T. M. Expression of Vascular Endothelial Growth Factor and Its Receptors in Hematopoietic Malignancies. *Cancer Research* (1 de Fevereiro de 1999) 59, 728-733
18. Guo, S.; Colbert, L.S.; Fuller, M.; Zhang, Y. Gonzalez-Perez, R. R. Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-2 in Breast Cancer. *Biochim Biophys Acta* (Agosto 2010) 1806 (1), 108-121

19. Kyle, R. a.; Vincent Rajkumar, S. Monoclonal Gammopathy of Undetermined Significance and Smoldering Multiple Myeloma. *Br. J. Haematol.* (2006), 134, 573–589
20. Bianchi, G.; Anderson, K. C. Understanding Biology to Tackle the Disease : Multiple Myeloma From Bench to Bedside, and Back. *CA A J. Clinicians* (2014), 64, 423–444
21. Landgren, O.; Morgan, G. J. Biologic Frontiers in Multiple Myeloma: From Biomarker Identification to Clinical Practice. *Clin. Cancer Res.* (2014), 20, 804–813
22. Lopes, M. R. Caracterização das células estromais mesenquimais derivadas de medula óssea de pacientes com síndromes mielodisplásicas e leucemia mielóide aguda e o estudo da biologia da interleucina-32 no microambiente medular. Campinas, SP (2016) 1-125
23. Teofili, L.; Martini, M.; Nuzzolo, E. R.; Capodimonti, S.; Iachininoto, M. G. Cocomazzi, A. et al. Endothelial Progenitor Cell Dysfunction in Myelodysplastic Syndromes: Possible Contribution of a Defective Vascular Niche to Myelodysplasia. *Neoplasia* (May 2015) Volume 17 Number 5, 401-409
24. Torres, C. Avaliação das células endoteliais em patologias que comprometem a integridade do endotélio. Beira Interior (Julho de 2010) 1-116
25. Zahran, A. M.; Aly, S. S.; Altayeb, H. A.; Ali, A. M. Circulating endothelial cells and their progenitors in acute myeloid leukemia. *Oncology Letters* (2016) 12, 1965-1970
26. Marinho, L. C. A angiogénese nas leucemias: uma revisão. (Agosto de 2016), 1-84
27. Labiba, H. A., Siamb, A. G. Circulating endothelial progenitor cells as a prognostic marker in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Egyptian Journal of Haematology* (2014), Vol 39 No 3, 139-142
28. Meireles, A. L. L. P. Quantificação de células endoteliais circulantes em portadores assintomáticos do vírus linfotrópico humano de células T do tipo 1 (HTLV1) por citometria de fluxo, São Paulo (2008) 1-129

29. Swerdlow, S. H.; Campo, E.; Pileri, S. P.; Harris, N. L.; Stein, H.; Siebert R. e col. The 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms. *BLOOD* (19 de Maio de 2016) 127, 20, 2375-2390
30. George, T. I. ;. Czuchlewski, D. R. The WHO is New: 2016 Updates to the Classification of Myeloid Neoplasms Home Columns Mini Review. *American Society of Hematology* (12 de Agosto de 2016) 13, 5